

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520091152984

UDC\_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

转录因子 TWIST1 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义

Expression of transcription factor Twist1 in bladder urothelial carcinoma and its clinical significance

唐宵峰

指导教师姓名: 邢金春 教授

专 业 名 称: 外科学(泌尿外)

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 4 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为( )课题(组)的研究成果，获得( )课题(组)经费或实验室的资助，在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘 要

**目的:** 通过检测转录因子 Twist1 在膀胱尿路上皮癌中的 mRNA 和蛋白表达情况, 探讨其表达与临床病理特征的关系。

**方法:** 分别采用实时荧光定量-PCR 和免疫组织化学技术, 检测 Twist1 在 42 例新鲜膀胱尿路上皮癌组织和 13 例配对癌旁正常膀胱粘膜中的 mRNA 表达情况, 及 40 例石蜡包埋膀胱尿路上皮癌组织和 14 例配对癌旁正常膀胱粘膜中的蛋白表达情况; 并分析其与临床病理特征间的关系。

**结果:** Twist1 mRNA 在 13 例膀胱癌组织的表达明显低于配对的正常膀胱粘膜 (中位数分别为  $1.47E-03$  和  $4.05E-03$ ,  $P < 0.01$ ), 其在膀胱癌中的表达,  $T_{a-1}$  期高于  $T_{2-4}$  期, G0 和 G1 高于 G2 级 ( $P < 0.05$ ), G0 与 G1 级间没有差异 ( $P > 0.05$ )。膀胱癌组织的 Twist1 蛋白阳性表达率为 90.0% (36/40), 明显高于正常粘膜的 7.14% (1/14) ( $P < 0.001$ ), 其阳性表达主要位于细胞核, 并存在间质部位细胞表达的现象; Twist1 蛋白表达与肿瘤分级、分期无关 ( $P > 0.05$ ), 其表达趋势与 mRNA 不一致, 两者均与患者年龄、性别以及是否吸烟无关 ( $P > 0.05$ )。

**结论:** Twist1 在膀胱尿路上皮癌的发生、发展过程中起促进作用, 其蛋白表达的上调可能与转录后调控的异常有关; Twist1 可能成为膀胱癌的肿瘤标记物和潜在的治疗靶标。

**关键词:** 膀胱肿瘤; Twist1; 基因表达; 免疫组织化学; 聚合酶链反应

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

**Objective:** To investigate the expression of twist1 mRNA and protein in bladder urothelial carcinoma (BUC), and illustrate their relationships with clinicopathological features.

**Methods:** The expression of twist1 mRNA in 42 fresh BUC specimens and 13 paired non-cancerous mucosas were detected by Real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (RFQ-RT-PCR). Meanwhile, Immunohistochemistry was used to detect the expression of twist1 protein in 40 paraffin embedded BUC specimens and 14 paired non-cancerous mucosas. And their relationships with clinicopathological features were statistically analyzed.

**Results:** We first showed that expression levels of Twist1 mRNA in 13 paired BUC specimens were significantly lower than the non-cancerous mucosas (median is  $1.47\text{E-}03$  and  $4.05\text{E-}03$ , respectively,  $P < 0.01$ ); The expression levels of Twist1 mRNA in stage  $T_{a-1}$  were higher than  $T_{2-4}$  ( $P < 0.05$ ), which tendency also exist between grade G1-2 and G3 ( $P < 0.05$ ). However, difference between grade G1 and G2 was not significant ( $P > 0.05$ ). The positive expression rate of twist1 protein in BUC specimens (90.0%, 36/40) was significantly higher than the non-cancerous mucosas (7.14%, 1/14) ( $P < 0.001$ ). Twist1 protein was mainly distributed in the nucleus, and expressed obviously in the mesenchyme cells of several specimens (13.9%, 5/36). The expressions of twist1 protein were not associated with TNM stages and grades ( $P > 0.05$ ). We first showed that expression tendency of twist1 protein was distinct from twist1 mRNA, and both were not correlated with age, gender, and smoking history ( $P > 0.05$ ).

**Conclusions:** Twist1 may play a role as an oncogene during the tumorigenesis and development of BUC, its abnormal protein expression may be associated with the

disordered regulations after transcription. Therefore, abnormal expression of twist1 protein may serve as a biomarker of BUC and provide us a new potential target for therapy.

**Keywords:** Bladder Cancer; Twist1; Gene Expression; Immunohistochemistry; Polymerase Chain Reaction

厦门大学博士论文摘要库



# 目 录

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 中文摘要                       | I   |
| 英文摘要                       | III |
| 第一章 前言                     | 1   |
| 1 膀胱尿路上皮癌研究概述              | 1   |
| 2 上皮间质转化诱导因子Twist1 在肿瘤中的作用 | 2   |
| 3 本研究的思路、目的和意义             | 3   |
| 第二章 材料和方法                  | 6   |
| 1 标本及临床资料                  | 6   |
| 2 主要试剂和仪器设备                | 6   |
| 3 组织中Twist1 mRNA的检测        | 9   |
| 4 免疫组织化学检测                 | 15  |
| 5 统计学分析                    | 16  |
| 第三章 实验结果                   | 17  |
| 第四章 讨论                     | 25  |
| 第五章 结论                     | 28  |
| 参考文献                       | 29  |
| 英文缩略词表                     | 34  |
| 致谢                         | 35  |
| 综述                         | 36  |

厦门大学博硕士论文摘要库

## Table of Contents

|  |            |
|--|------------|
| <b>Abstract in Chinese .....</b>                           | <b>I</b>   |
| <b>Abstract in English .....</b>                           | <b>III</b> |
| <b>Chapter 1 Introduction .....</b>                        | <b>1</b>   |
| 1 Bladder Urothelial Carcinoma .....                       | 1          |
| 2 Role of EMT-inducing Factor Twist1 in Human Cancer ..... | 2          |
| 3 Mentality, Aims and Significance of Paper .....          | 3          |
| <b>Chapter 2 Materials and Methods .....</b>               | <b>6</b>   |
| 1 Specimens and Clinical Data .....                        | 6          |
| 2 Reagents and Instruments .....                           | 6          |
| 3 RNA Extraction and RFQ-RT-PCR .....                      | 9          |
| 4 Immunohistochemistry Staining .....                      | 15         |
| 5 Statistical Analysis .....                               | 16         |
| <b>Chapter 3 Results .....</b>                             | <b>17</b>  |
| <b>Chapter 4 Discussion .....</b>                          | <b>25</b>  |
| <b>Chapter 5 Conclusion .....</b>                          | <b>28</b>  |
| <b>References .....</b>                                    | <b>29</b>  |
| <b>Abbreviation .....</b>                                  | <b>34</b>  |
| <b>Acknowledgments.....</b>                                | <b>35</b>  |
| <b>Review .....</b>  | <b>36</b>  |

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 前言

### 1. 膀胱尿路上皮癌研究概述

膀胱癌是一种常见的恶性肿瘤，被覆尿路上皮统称为尿路上皮或移行上皮，本文主要采用尿路上皮的概念，故又将膀胱癌称为膀胱尿路上皮癌（bladder urothelial carcinoma, BUC）。膀胱癌在不同国家、不同地区及不同民族间的发病率存在差异，世界各国的年龄标准化发病率（age standardised incidence rate, ASR）男性为 10.1/10 万，女性为 2.5/10 万，死亡率男性为 4/10 万，女性为 1.1/10 万<sup>[1]</sup>。在美国，膀胱癌发病率居男性第四位，女性第十二位，死亡率男性列第七位，女性第十五位<sup>[2]</sup>。在我国，其发病率和死亡率均占泌尿男生殖系统肿瘤的首位，但其发病率远低于西方国家。膀胱癌可发生于任何年龄，甚至于儿童。但是主要发病年龄为中年以后，并且其发病率随年龄增长而增加<sup>[3]</sup>。不同人群的膀胱癌组织类型不同，在中国、美国等大多数国家中，以移行细胞癌（尿路上皮癌）为主，占膀胱癌的 90% 以上，而埃及则以鳞状细胞癌为主，约占膀胱癌的 75%<sup>[4]</sup>。

随着基础研究的发展和临床诊疗技术的进步，现在膀胱癌患者往往可以在更早期的阶段便得到诊断，从而获得更及时的治疗和改善预后。然而，我们至今仍缺乏一种无创的、高敏感性和高特异性的早期筛查手段，这使得部分病人在确诊膀胱癌时肿瘤已浸润肌层甚至有的已发生转移，这提示我们寻找一种理想的膀胱癌特异性的肿瘤标记物，是我们未来的研究方向之一。同时，由于膀胱尿路上皮癌具有多中心、反复复发、易局部浸润和远处转移等生物学特性，使得我们对膀胱癌的治疗不仅仅是手术，更强调综合治疗，其中包括放化疗和免疫治疗等辅助治疗方式。比如，对于中危和高危的非肌层浸润性膀胱癌，术后 24 小时内即刻膀胱灌注治疗后，建议继续膀胱灌注化疗，但是有研究显示非肌层浸润性膀胱癌维持灌注治疗 6 个月以上时不能继续降低肿瘤的复发概率<sup>[5]</sup>，这某种程度上提示了肿瘤细胞对化疗药物产生了耐药性。对于初发的肌层浸润性膀胱癌来说，即使接受了手术和其他综合治疗，最终仍会有一半会死于肿瘤引起的肿瘤转移<sup>[6]</sup>。虽然大部分膀胱癌患者确诊时处于分化良好或中等分化的非肌层浸润性膀胱癌，仍有部分患者最终发展为肌层浸润性膀胱癌或转移性膀胱癌。如何逆转肿瘤细胞对放化疗的耐受性，抑制肿瘤的浸润进展及远处转移，从而改善患者的预后，是目

前肿瘤研究的热点之一。当然，所有的疾病都应重在一级预防，对于肿瘤来说更因如此，通过探索肿瘤早期发生发展的潜在机制，可从源头上为预防肿瘤发生和降低发病率提供理论依据。

## 2. 上皮间质转化诱导因子Twist1 在肿瘤中的作用

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指在某些因素的作用下，上皮细胞失去极性，细胞间紧密连接和黏附连接丢失，细胞骨架重塑，获得间叶细胞形态及特性的过程<sup>[7]</sup>。最初研究发现 EMT 在胚胎发育过程中起重要作用，之后大量研究亦表明其在创伤修复、器官纤维化及肿瘤的侵袭和转移中也起着重要的作用<sup>[8]</sup>。胚胎发育过程中 EMT 相关的分子及表型变化，也见于恶性肿瘤细胞，比如上皮细胞粘附分子 E-钙粘蛋白(E-cadherin, 也称 CDH1, 下面简称 E-cad) 的表达下调，基底膜降解相关基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)的表达增加，以及转录因子 Twist1 的核转位表达等<sup>[9]</sup>。

Twist1 属于碱性螺旋环螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子，它在进化过程中高度保守，最早在果蝇胚胎研究中发现，它参与了胚胎发育过程中的细胞重建，对于细胞的迁移能力有重要调节作用<sup>[10]</sup>。哺乳动物中存在两种 Twist 基因，Twist1 (也称 Twist) 和 Twist2 (也称 Dermo-1)，其表达的蛋白羧基端有 90%是一致的<sup>[11]</sup>。近来多组研究表明，Twist1 具有癌基因的特征，可诱导肿瘤细胞发生上皮-间质转化，促进肿瘤的发生发展及侵袭转移；Twist1 可诱导肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的产生，抑制细胞的凋亡，参与肿瘤的化疗耐药及血管生成等<sup>[12, 13]</sup>。

Twist1 在肿瘤进展中通过几种直接或间接的途径，扮演着分子开关的角色，通过与 E-box 序列直接结合、共刺激分子或抑制剂的招集、E-钙粘蛋白调节子的隔离以及特定刺激/抑制因子作用的阻断等方式，并通过时空差异表达、磷酸化调节、二聚体形成及细胞内定位等手段，对 EMT 相关因子等靶分子的表达及作用进行调控<sup>[14]</sup>。比如，Twist1 可通过激活其下游靶基因 Bmi1 的表达(后者为多梳蛋白，常在肿瘤中高表达，可维持细胞自我更新能力，尤其是促进某些干细胞群的自我更新)，协同抑制 E-cad 的表达，共同促进 EMT 和肿瘤的发生，并建立了 EMT 与肿瘤干细胞间的关系<sup>[15, 16]</sup>。最近的研究认为肿瘤干细胞的出现，在某

种程度上归功于 EMT（比如通过肿瘤基质成分的诱导），所以 EMT 在使肿瘤细胞获得迁移能力的同时，也使其具有与肿瘤干细胞相似的特性，从而促进了细胞增殖和获得化学耐药<sup>[17]</sup>。目前，在多种肿瘤中发现 Twist1 与肿瘤的进展和转移有关，Twist1 可通过抑制 E-cad<sup>[18, 19]</sup>、激活 MMPs<sup>[20, 21]</sup>、激活 miR-10b 表达<sup>[22]</sup>、促进侵袭性伪足形成<sup>[23]</sup>、STAT3 通路<sup>[24]</sup>及凝血酶<sup>[25]</sup>等途径促进肿瘤细胞的侵袭和转移。近来的多数研究表明，Twist1 蛋白在结直肠癌<sup>[26]</sup>、肺癌<sup>[21]</sup>、肝癌<sup>[24]</sup>、胃癌<sup>[27]</sup>及乳腺癌<sup>[28]</sup>等多种肿瘤中存在高表达，且与患者预后不良有关。

目前在膀胱尿路上皮癌中有关Twist1的研究仍较少。最初，Wang等研究认为Twist1蛋白的表达上调与膀胱癌等对长春新碱的化疗耐药有关，后者是通过降解细胞微管促进细胞凋亡发挥抗癌作用<sup>[29]</sup>。有研究表明，Twist1在膀胱癌中的表达较正常组织明显上调，其表达与肿瘤的分级、分期有关，与E-cad的表达呈负相关，提示Twist1参与了膀胱肿瘤的进展<sup>[30, 31]</sup>。其他研究<sup>[32, 33]</sup>亦有类似发现，并认为Twist1的表达与膀胱癌患者预后有关，烟草接触可促进Twist1等EMT标记物的表达上调<sup>[32]</sup>。Shiota等在膀胱癌研究中发现，Twist1通过参与调节Y-box结合蛋白-1（Y-box binding protein, YB）的表达（Y-box结合蛋白-1是一种多功能蛋白，与转录调节、翻译调控、mRNA选择性剪接、DNA的修复、细胞增殖和再生等有关），促进了细胞的恶性潜能，从而在肿瘤的生长、侵袭、转移以及对顺铂和阿霉素的耐药中发挥重要作用<sup>[34]</sup>。尿路上皮癌中Twist1和YB-1的表达受到Foxo3a（Foxo3a属于叉形头转录因子的O亚型，属于肿瘤抑制基因）的负向调节<sup>[35]</sup>。显然，表达上调的Twist1蛋白可成为膀胱肿瘤的标记物之一。值得一提的是，现在的观点普遍认为基因甲基化程度与其蛋白表达呈负相关，而Renard等<sup>[36]</sup>的研究则发现，Twist1在膀胱癌中的甲基化程度亦明显高于正常粘膜，并且通过对尿脱落细胞进行Twist1甲基化检测，可提供一种高敏感、高特异的无创筛查方式。

### 3. 本研究的思路、目的和意义

在我国，膀胱癌是男性泌尿生殖系统最常见的肿瘤，虽然随着科学技术的进步，有越来越多的患者可以被早期诊治，但其发病率却未见减少，并存在肿瘤复发、进展和转移等问题。而且部分患者确诊时已为浸润性膀胱癌，加上存在肿瘤化疗耐药等问题，导致多数患者预后不良。通过研究膀胱癌中某种基因的表达，

并探讨其与临床病理特征的关系,可阐明该基因在膀胱癌中可能的作用机制,从而为临床的诊断、治疗、预防及相关基础研究提供一些初步依据。目前国内外已有大量研究表明, Twist1 在人类多种肿瘤中扮演癌基因的重要角色,但是其在膀胱尿路上皮癌中的研究仍较少。显然, Twist1 在膀胱尿路上皮癌发病过程中的意义目前仍未得到明确。Zhang 等对膀胱癌的研究表明, Twist1 蛋白在肿瘤中的阳性表达率 ( $>90\%$ ) 明显高于正常组织 ( $20\%$ ), 且主要表达于细胞质, 并与肿瘤的分级、分期有关, 认为 Twist1 的表达与肿瘤的进展有关<sup>[30]</sup>, 但亦有研究表明 Twist1 蛋白在膀胱癌中的阳性率仅为  $40\%$  左右<sup>[31-33]</sup>。而且, 关于 Twist1 蛋白在膀胱癌中的表达部位, 以及 Twist1 的表达与患者临床病理特征间的关系, 目前仍缺乏更大样本量的研究来证实。与 Zhang 等<sup>[30]</sup>的研究结论不同, Eelke<sup>[37]</sup>等对乳腺癌的研究表明, Twist1 蛋白主要表达于肿瘤的细胞核中, 而且其表达与肿瘤的临床病理特征无关。

目前, 在包括膀胱尿路上皮癌等多种肿瘤中, Twist1 表达的调控机制尚未得到明确, 其蛋白表达与 mRNA 表达之间的关联亦未建立起来。Gort 等<sup>[37]</sup>通过对浸润性乳腺癌和正常乳腺组织的研究表明, Twist1 mRNA 在肿瘤和正常组织中的表达差异无统计学意义, 而 Twist1 蛋白在肿瘤中的表达明显高于正常组织, 且主要阳性表达于细胞核中, 认为 Twist1 蛋白参与了肿瘤的发展, 甚至在肿瘤发生的早期阶段亦发挥重要作用, 他们的研究还发现 Twist1 的甲基化程度与其 mRNA 的表达及蛋白表达水平无关, 认为 Twist1 蛋白在肿瘤中的表达上调可能主要与基因表达的转录后调控有关。最近多项研究表明, Twist1 蛋白在细胞中的高表达与蛋白磷酸化有关。Su 等<sup>[38]</sup>研究发现, 在多种头颈肿瘤细胞株中 Twist1 受到 IL-6 的正向调节 (IL-6 在细胞中主要通过磷酸化级联反应发挥作用), 且与转录水平无关, 进一步研究发现 IL-6 通过蛋白激酶使 Twist1 的 S18 和 S20 氨基酸 (S 代表丝氨酸) 序列发生磷酸化, 从而稳定了 Twist1 蛋白在细胞中的表达, 作者认为 Twist1 蛋白的表达主要受到转录后的严密调控, 以便对外界的刺激迅速做出反应。Hong 等<sup>[39]</sup>通过质谱分析和特异性抗体研究发现丝氨酸 68 (Ser68) 作为 Twist1 发生磷酸化的主要位点, 在乳腺癌等细胞中其磷酸化程度与 Twist1 蛋白表达水平呈正相关。Ras 蛋白 (最初发现于大鼠肉瘤病毒, 是一类能与鸟苷三磷酸结合的单体 GTP 结合蛋白, 通过脂锚与质膜结合, 参与细胞内的信号转



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库